

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 9 (1978)

Artikel: Étude de la croissance de protonémas de mousse (Funaria hygrometrica) en milieu liquide
Autor: Naef, Jacques / Simon, Patrice
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099298>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Etude de la croissance de protonémas de mousse (*Funaria hygrometrica*) en milieu liquide

JACQUES NAEF & PATRICE SIMON

Résumé

NAEF, J. & P. SIMON (1978). Etude de la croissance de protonémas de mousse (*Funaria hygrometrica*) en milieu liquide. *Saussurea* 9: 51-56.

Une méthode de préculture de protonémas de mousse en milieu liquide est décrite. Deux procédés de subculture sont comparés: culture semi-continue ouverte et culture en volume limité. Il est possible d'obtenir une quantité appréciable de protonémas dans des conditions bien contrôlées et ayant la densité voulue. Le choix de la culture qui peut servir de base pour des expériences de morphogénèse est discuté.

Abstract

NAEF, J. & P. SIMON (1978). Growth studies on the protonema of the moss *Funaria hygrometrica* in liquid media. *Saussurea* 9: 51-56. In French.

A method for preculture of moss protonemata in liquid medium is described. Two subculture techniques are compared: semi-continuous open culture and limited-volume culture. Under controlled conditions a considerable amount of protonemata in the desired density is obtained. The choice of a suitable medium for morphogenetical experiments is discussed.

Introduction

La culture en masse de protonémas de mousse *in vitro* en milieu liquide requiert, pour être réalisée avec assez de succès, des conditions bien établies et contrôlées.

Plusieurs méthodes ont été proposées par divers auteurs tels que HAHN & BOPP (1968), SZWEYKOWSKA & al. (1970), KOFLEK (1959). Nous avons mis au point un dispositif de culture en milieu liquide qui donne toute satisfaction (NAEF, 1975). Il est à remarquer que le mode d'isolement des spores ainsi que leur nombre à l'ensemencement constituent des facteurs agissant ultérieurement sur la culture (KOFLEK, 1959).

La croissance des protonémas n'étant pas toujours identique, il s'avère que l'environnement joue un rôle important dans ce processus. Par ailleurs, des rai-

sons intrinsèques, non contrôlables dans la plupart des cas, sont à l'origine de différences importantes d'une culture à l'autre. Cela fait que des cultures prélevées en même temps n'ont pas toujours nécessairement le même aspect ni le même âge physiologique. Ceci peut limiter, dans des recherches sur la morphogénèse, l'information que l'on peut tirer des résultats.

Ces considérations nous ont amenés à réaliser des cultures dans des conditions davantage contrôlées et à rechercher quel était l'état le plus favorable des protozoaires, de même que leur meilleure densité, pour faire débiter des expériences subséquentes.

Obtention des précultures

Isolement des spores

Les spores proviennent de sporanges récoltés à maturité (début de brunissement) et gardés en papillotes au sec. Au moment voulu, les sporanges sont désinfectés dans des boîtes de Pétri au moyen des traitements suivants: passage pendant une minute dans de l'alcool à 70°, puis trempage pendant 5 minutes dans une solution de bichlorure de mercure à 2%, suivi de trois lavages à l'eau stérile. Les sporanges sont déchirés à l'aide d'une pince et d'une aiguille et les spores sont recueillies sur une lamelle couvre-objet stérile qui est ensuite plongée dans un erlenmeyer pourvu d'un barreau aimanté et contenant 50 ml d'eau ou de solution nutritive stérile additionnée de 0.25 ml d'une solution aqueuse de Tween 20 à 0.1%. Le récipient est placé sur un agitateur magnétique pendant 2 à 3 heures puis abandonné une nuit. Après avoir fait un prélèvement aseptique, les spores sont comptées dans une cellule de Fuchs-Rosenthal. Ce comptage est difficile à réaliser avec exactitude car il dépend essentiellement du mouillage des spores qui est très irrégulier. Le contenu de l'erlenmeyer est déversé dans un flacon à culture et du milieu nutritif est ajouté de telle sorte que la densité des spores soit de 3×10^6 spores par litre de solution.

Appareillage

Les précultures se font dans un dispositif semblable à celui qui a déjà été décrit (NAEF, 1975). Quelques modifications lui ont été cependant apportées. Elles portent essentiellement sur le récipient de culture. Celui-ci est un fermenteur d'une capacité de 6 l, de forme cylindrique avec un fond hémisphérique. La partie supérieure est obturée par un couvercle amovible muni d'un joint étanche (O-ring) et pourvu de 6 tubulures à joints et fermeture Sovirel de différents diamètres. Cela permet de mettre en place des accessoires tels que vibro-mélangeur Chemap, tube d'entrée et de sortie d'air, tube d'entrée et de sortie de milieu nutritif, sonde de température, électrode de pH.

Le prélèvement de liquide se fait au moyen d'un tube de verre de 6 mm de diamètre qui plonge dans le milieu de culture. Celui-ci est raccordé à l'extérieur

du fermenteur à un tube de silicone dont l'extrémité est obturée par une pince de Mohr immergée dans un récipient contenant de l'alcool.

La solution nutritive fraîche arrive par un tube court qui est raccordé à une réserve placée au-dessus du fermenteur.

Le système d'aération et d'agitation ainsi que ceux de mesure de la température et du pH demeurent inchangés. Ces derniers peuvent être enregistrés et contrôlés automatiquement.

Eclairage et température

La lumière est fournie par une double série de 4 tubes fluorescents Philips TL 25 et 15 W (n° 55: type lumière du jour). Ces tubes sont disposés en carré autour du fermenteur sur des supports à mi-hauteur de celui-ci. L'irradiance à l'emplacement du fermenteur est de $1320 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, ce qui correspond environ à 3000 lux d'éclairage. Cette quantité de lumière est en fait trop importante, surtout si l'on tient compte des exigences naturelles. Dans la pratique, la lumière est réduite d'environ $\frac{1}{3}$, par l'utilisation de la seule série de tubes de 25 W.

La température est maintenue à l'intérieur du fermenteur à 25°C , au moyen d'un bain thermostaté décrit précédemment (NAEF, 1975).

Milieu de culture

Nous utilisons le milieu de Heller (HELLER, 1953) ou celui de KOFLEK (1959) sans nitrate d'ammonium (milieu A), dont le pH est d'environ 6, sans adjonction de substance organique.

Analyse de la croissance

Nous avons choisi comme critère de croissance le poids de matière sèche des protonémas contenus dans 100 ml de milieu nutritif. Cela permet aussi de contrôler indirectement l'état de la culture à tout moment.

Deux procédés de culture ont été envisagés. La culture en volume limité (batch culture) et la culture semi-continue ouverte. Dans le premier, les spores forment des protonémas qui ne tardent pas à constituer, après 10 jours, une masse importante, ce qui a pour effet de ralentir la croissance. En utilisant le second procédé, on opère une dilution appropriée dès le 7^e ou le 8^e jour de manière à obtenir une croissance qui ne dépasse pas un certain niveau, qui est de l'ordre de $40 \mu\text{g}/\text{ml}$. Ce type de dilution n'étant effectué qu'une seule fois par jour, il s'agit bien de la réalisation d'une culture semi-continue ouverte mais elle n'est pas automatisée. Dans le cas où le système est stable, on peut l'automatiser et l'élimination ainsi que l'adjonction de milieu peuvent se réaliser grâce au fonctionnement d'une pompe péristaltique munie d'un tuyau de 10 mm.

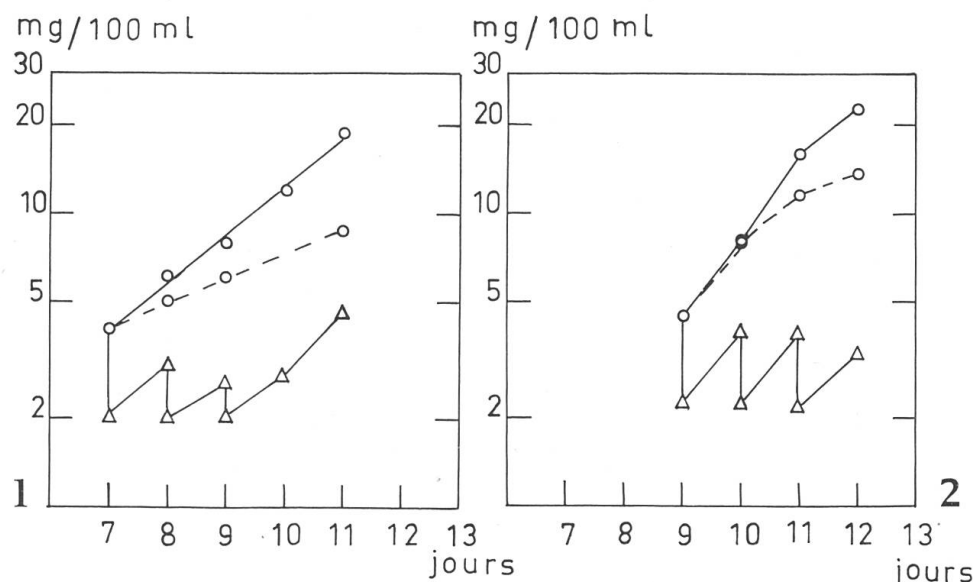


Fig. 1 et 2. — Accroissement des cultures-mères de protonémas de *Funaria*. Culture semi-continue ouverte après calcul de la dilution: cercles et trait continu. Culture semi-continue ouverte en valeur absolue après dilution: triangles et trait continu. Culture en volume limité: cercles et trait interrompu.

Dans les conditions de culture avec dilution, la concentration des protonémas est régulièrement amenée à une valeur constante. Il convient de remarquer que les expériences dont deux résultats sont représentés aux figures 1 et 2, consistent à cultiver des protonémas dans les deux conditions décrites plus haut et ayant des spores provenant de la même récolte. Ces dernières sont introduites dans un fermenteur puis, lorsque la culture-mère a atteint la densité suffisante, le volume est partagé en deux et la culture est poursuivie dans deux fermenteurs simultanément.

Lorsque les protonémas sont maintenus en culture en volume limité, le poids de matière sèche évolue de la manière suivante (résultat d'une expérience): $40 \mu\text{g/ml}$ au 7^e jour et $80 \mu\text{g/ml}$ le 11^e jour. En culture semi-continue ouverte, en utilisant la même culture-mère, les valeurs calculées en fonction de la dilution sont de: $40 \mu\text{g/ml}$ au 7^e jour et $190 \mu\text{g/ml}$ au 11^e jour (fig. 1). Ces chiffres expriment la capacité de croissance de la culture.

En comparant les courbes calculées de deux cultures semi-continues ouvertes (fig. 1 et 2), on constate que dans le premier cas, le poids de matière sèche atteint $40 \mu\text{g/ml}$ au 7^e jour, alors que dans l'autre cette valeur n'est mesurée qu'au 9^e jour. La courbe de la figure 1 montre que la croissance est assez rapide, le temps de doublement de la culture est de 1.9 tandis que celle de la figure 2 présente une croissance encore plus rapide puisque le temps de doublement de la culture est de 1.

Les cultures semi-continues ouvertes sont aussi représentées directement sur les mêmes graphiques sans tenir compte du calcul de la dilution (triangles et trait continu). On remarque que la croissance est assez bien stabilisée. La croissance des protonémas cultivés en volume limité a tendance à diminuer assez précocement (cercles et trait interrompu).

Discussion

L'obtention de protonémas en milieu liquide est relativement aisée si l'on tient compte de certaines caractéristiques de leur croissance.

La culture en volume limité présente l'avantage de pouvoir être faite en utilisant des volumes de milieu nutritif relativement modestes. Les pertes dues à l'évaporation sont d'ailleurs assez faibles. Celles-ci sont de l'ordre de 6.6 ml par jour dans un erlenmeyer contenant 1.5 l de milieu nutritif. L'inconvénient est d'avoir une densité de culture qui augmente continuellement, suivie d'un ralentissement dû à une trop grande abondance de protonémas. Celui-là pourrait être dû soit à un début d'épuisement du milieu nutritif, bien que cela paraisse peu probable en regard des concentrations des solutions utilisées (un simple calcul permet de s'en convaincre), soit à la libération de substances de déchet qui auraient une action inhibitrice, ou encore à un effet de saturation de l'espace dans le récipient de culture.

L'avantage de la culture semi-continue ouverte est de pouvoir obtenir une masse de protonémas en bonne condition avec un ralentissement minimum de la vitesse de croissance. Une telle culture peut servir de base pour des expériences ultérieures avec des protonémas bien développés et dont la densité est satisfaisante au moment souhaité. L'inconvénient est de devoir procéder à des dilutions quotidiennes et de faire une culture-mère qui exige un grand volume de milieu dont seule une faible partie sera finalement utilisée.

Le dépassement d'une certaine densité provoque un ralentissement de la croissance, donc le but de la dilution est de maintenir les protonémas dans un volume qui leur permet de se développer au mieux. Cela permet d'avoir des cultures plus comparables entre elles.

Il paraît judicieux de choisir une méthode qui permette de contrôler le plus de paramètres possibles et d'obtenir des cultures assez homogènes. Pour y parvenir, la culture semi-continue ouverte semble être favorable. Elle permet de procurer des protonémas en quantité suffisante pour déterminer la croissance par mesure pondérale d'un échantillon et ceux-là se trouvent dans un état favorable à une induction par une cytokinine dès le 8^e ou le 9^e jour par exemple. Il s'agit surtout de chloronémas selon la définition de BOPP (1959). D'une manière générale, il convient d'attendre toutefois le 10^e jour pour faire une subculture de bonne qualité. La mesure du poids de matière sèche est une bonne indication pour connaître le volume de milieu à prélever pour faire des cultures expérimentales. Nous utilisons à cet effet des cultures dont le poids de matière sèche est de 3 à 5 mg/100 ml.

La méthode que nous avons utilisée ne permet pas, par contre, de suivre l'évolution de protonémas isolés tel que divers auteurs comme SZWEYKOWSKA & al. (1968), BOPP & DIEKMANN (1967), JOHRI (1975) l'ont fait.

Le nombre de spores à l'ensemencement est assez aléatoire et entraîne des différences sensibles du nombre de protonémas qui se développent. Par conséquent, les cultures auront une densité différente à moins de l'ajuster. Cela n'est possible que 5 jours après la germination car, jusqu'à ce moment, les spores adhèrent au verre. Toutefois, ce n'est pas le seul facteur qui entre en ligne de compte dans l'obtention de cultures-mères ayant exactement la même croissance. Il faut

encore remarquer que la culture doit être conduite méticuleusement, car en milieu liquide aéré et agité, la vitesse de croissance est augmentée par rapport à celle qui se manifeste en milieu solide ou liquide non aéré, de sorte que la moindre fluctuation du système est ressentie profondément. C'est la raison pour laquelle nous avons toujours fait des cultures-mères dans les mêmes conditions de température et d'éclairage, les fermenteurs étant eux-mêmes soustraits à l'influence de la lumière directe. Avec la culture semi-continue ouverte on obtient rapidement une grande masse de protonémas, ce qui est appréciable pour réaliser des expériences de morphogenèse que nous avons réalisées par la suite.

BIBLIOGRAPHIE

- BOPP, M. (1959). Neue Gesichtspunkte zum Problem des Protonemadifferenzierung. *Rev. Bryol. Lichénol.* 28: 319-325.
- & W. DIEKMANN (1967). Versuche zur Analyse von Wachstum und Differenzierung der Moosprotonemen. *Planta* 74: 86-96.
- HAHN, H. & M. BOPP (1968). A cytokinin test with high specificity. *Planta* 83: 115-118.
- HELLER, R. (1953). *Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés in vitro*. Thèse, Paris.
- JOHRI, M. M. (1975). The protonema of *Funaria hygrometrica* as a system for studying cell differentiation. In: H. Y. MOHAN RAM (ed.), *Form, Structure and Function in Plants*: 116-124. Meerut.
- KOFLER, L. (1959). Contribution à l'étude biologique des mousses cultivées en vitro: germination des spores, croissance et développement de protonémas chez *Funaria hygrometrica*. *Rev. Bryol. Lichénol.* 28: 1-202.
- NAEF, J. (1975). Dispositif de culture de protonémas de mousse en milieu liquide. *Saussurea* 6: 307-312.
- SZWEYKOWSKA, A., I. GUZOWSKA & J. GALLAS (1968). Studies on the activity of kinetin in culture of *Funaria hygrometrica*. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 37/2: 202-206.
- J. SCHNEIDER & U. PRUSINSKA (1970). A cytokinin bioassay based on bud induction in the protonema of *Funaria hygrometrica*. *Zesz. Nauk. Univ. Mikołaja Kopernika, Toruniu (Biol.)* 13: 288-292.